



สารพฤกษเคมีเบื้องต้น ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และความเป็นพิษต่อเซลล์จาก
สารสกัดหยาบของกิ่งมะยงชิด
Phytochemical Screening, Total Phenolic and Flavonoid
Contents, Antioxidant and Cytotoxic Activities from
Twig Crude Extracts of *Bouea burmanica* Griff.

ณัฐพงศ์ ลำขวัญ, พัทวดี สีสาว*

สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม พิษณุโลก 65000

Natthaphong Lamkhwan, Pattawat Seekhaw*

Chemistry Department, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University,
Phitsanulok 65000

Received 21 May 2024; Received in revised 4 October 2024; Accepted 7 November 2024

บทคัดย่อ

แนวโน้มการใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติกำลังได้รับความสนใจอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน เนื่องจากมีความปลอดภัยมากกว่าสารเคมีสังเคราะห์ เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และสามารถป้องกันโรคร้ายหลายชนิดได้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และความเป็นพิษต่อเซลล์ Human keratinocyte immortal (HaCaT) ของสารสกัดหยาบกิ่งมะยงชิดที่สกัดด้วยเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล การตรวจสอบสารพฤกษเคมีจากสารสกัดของกิ่งมะยงชิดพบ ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ สเตียรอยด์ แอนทราควิโนน ไตรเทอร์พีน ไดเทอร์พีน และแทนนิน เป็นองค์ประกอบ การตรวจสอบปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent และ aluminium chloride colorimetric ตามลำดับ พบว่า สารสกัดเมทานอลมีปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด (20.24 ± 3.77 mg GAE/g DW และ 5.41 ± 0.12 mg QE/g DW ตามลำดับ) อีกทั้งยังแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดทั้ง 3 วิธี ได้แก่ DPPH, ABTS (IC_{50} เท่ากับ 1.14 ± 0.16 และ 47.86 ± 1.39 μ g/mL ตามลำดับ) และ FRAP (FRAP value เท่ากับ 227.87 ± 3.85 mg $FeSO_4$ equivalent/g DW) ส่วนผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT ที่ความเข้มข้น 1,000 μ g/mL พบว่า สารสกัดเอทิลอะซิเตทมีค่าร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับปานกลาง (39.19 ± 0.04) และมีค่าความเป็นพิษน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดอื่น สารสกัดจากกิ่งมะยงชิดจึงควรค่าแก่การนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพในอนาคต

*ผู้รับผิดชอบบทความ: pattawat.s@psru.ac.th

doi: xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

คำสำคัญ: สารพฤกษเคมี;ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ; ความเป็นพิษต่อเซลล์; มะยงชิด

Abstract

Natural product use is currently trending because these products are safer than synthetic chemicals, serve as sources of bioactive compounds, and help prevent various diseases in human. This study aimed to investigate the phytochemical screening, total phenolic and flavonoid contents, antioxidant activity, and cytotoxic effects on human keratinocyte immortal (HaCaT) cells of crude extracts from the twigs of *Bouea burmanica* Griff. Crude extracts were obtained using hexane, ethyl acetate and methanol. Phytochemical screening indicated the presence of phenolics, flavonoids, steroids, anthraquinones, diterpenes, triterpenes and tannins. Total phenolic and flavonoid contents were determined using the Folin-Ciocalteu reagent and aluminium chloride colorimetric methods, respectively. The results revealed that the methanol extract had the highest total phenolic and flavonoid contents (20.24 ± 3.77 mg GAE/g DW and 5.41 ± 0.12 mg QE/g DW, respectively). Furthermore, three different antioxidant assays; DPPH, ABTS, and FRAP, were conducted. The methanol extract exhibited the strongest antioxidant activity, with IC_{50} values of 1.14 ± 0.16 μ g/mL for DPPH and 47.86 ± 1.39 μ g/mL for ABTS, while the FPAP assay yielded a value of 227.87 ± 3.85 mg $FeSO_4$ equivalent/g DW. Cytotoxicity testing on HaCaT cells at a concentration of 1,000 μ g/mL showed that the ethyl acetate extract had moderate cytotoxicity (39.19 ± 0.04) and was less cytotoxic to HaCaT cells than the other extracts. The results suggest that extracts from the twigs of *B. burmanica* have potential for development in the field of healthcare products.

Keywords: Phytochemicals; Antioxidant activity; Cytotoxicity; *Bouea burmanica* Griff

1. บทนำ

ประเทศไทยอุดมไปด้วยทรัพยากรธรรมชาติและความหลากหลายทางชีวภาพของพรรณไม้นานาชนิด ซึ่งมีพืชกว่า 11,000 สปีชีส์ ถูกพบในประเทศไทย และเป็นโครงสร้างพื้นฐานความต้องการของมนุษย์ไม่ว่าจะเป็นอาหาร ที่พักอาศัย เครื่องนุ่งห่ม อีกทั้งยังเป็นแหล่งของสารสำคัญต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ คนไทยจึงมีการนำพืชสมุนไพรที่มีเอกลักษณ์เฉพาะตัวมาท้องถิ่นมาใช้ประโยชน์ทั้งการเป็นอาหารสมุนไพร เครื่องสำอาง และยารักษาโรค [1] โดยองค์ประกอบที่ทำให้พืชมีบทบาทสำคัญต่อชีวิตมนุษย์คือ สารพฤกษเคมี (Phytochemicals) ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีอยู่ตามธรรมชาติ

สามารถพบได้จากส่วนต่าง ๆ ของพืช โดยพืชจะสร้างสารเหล่านี้ขึ้นมาเพื่อปกป้องตัวเองจากโรค และศัตรูพืช รวมถึงเป็นองค์ประกอบของสี กลิ่น และรสชาติที่มีเอกลักษณ์เฉพาะตัวของพืชชนิดนั้น ๆ [2] ในธรรมชาติ มักจะพบสารกลุ่มฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แคโรทีนอยด์ เทอร์ปีนอยด์ สเตียรอยด์ อัลคาลอยด์ และน้ำมันหอมระเหยเป็นองค์ประกอบหลักของสารพฤกษเคมี [3, 4] ซึ่งมีหน้าที่สำคัญต่อมนุษย์ในการเป็นสารเมตาบอไลซึมขั้นทุติยภูมิในการต้านอนุมูลอิสระที่มีศักยภาพ ช่วยเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ล้างสารพิษ ทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาท เป็นโคเอนไซม์ที่มีส่วนช่วยในการทำงานของระบบต่าง ๆ ภายในร่างกาย

อีกทั้งยังช่วยป้องกันโรคเรื้อรัง เช่น โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคหัวใจ และโรคไขมันในหลอดเลือดสูง เป็นต้น [5] ทำให้ในปัจจุบันได้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสารพฤกษเคมีกันอย่างกว้างขวางทั้งการสกัด แยก และระบุองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ ความเป็นพิษต่อเซลล์ เสถียรภาพและคุณสมบัติทางเคมี ตลอดจนการนำไปพัฒนาเป็นยารักษาที่มีประสิทธิภาพหรือแม้แต่ผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพต่าง ๆ เพื่อเพิ่มทางเลือกให้กับผู้บริโภคที่ต้องการใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติแทนการใช้สารสังเคราะห์ [6]

มะยงชิด (*Bouea burmanica* Griff.) เป็นพืชอยู่ในวงศ์ Anacardiaceae มีถิ่นกำเนิดในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เป็นไม้ผลยืนต้นวงศ์เดียวกับมะม่วง มะปราง และมะกอก เป็นพืชไม่ผลัดใบ ใบเดี่ยวปลายแหลมยาวรีคล้ายใบมะปราง มีดอกเป็นช่อขนาดเล็กสีเหลือง ผลมีขนาดใหญ่กว่ามะปราง รูปทรงกลมรี ผลที่ยังไม่สุกมีสีเขียว ผลสุกมีสีเหลือง รสชาติหวานอมเปรี้ยว แต่แต่สายพันธุ์ เมล็ดมีสีม่วง [7] มะยงชิดเป็นพืชเศรษฐกิจของไทยที่มีมูลค่าสามารถสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกรของไทย เบื้องต้นมีการรายงานว่ามีใบของมะยงชิดสามารถนำไปใช้เป็นสีย้อม [8] โดยพบว่าน้ำย้อมสีจากใบมะยงชิดมีกลุ่มสารฟีนอลิก แทนนิน ไตรเทอร์พีน และแอนทราควิโนน เป็นองค์ประกอบ และน้ำย้อมสีดังกล่าวยังไม่มีความเป็นพิษเฉียบพลันต่อการระคายเคืองและการกัดกร่อนของผิวหนังในกระต่าย [9] จากข้อมูลดังกล่าวแล้วนั้นยังไม่พบรายงานเกี่ยวกับองค์ประกอบและฤทธิ์ทางชีวภาพจากส่วนต่าง ๆ ของมะยงชิด แต่พบว่าพืชในวงศ์เดียวกับมะยงชิด เช่น มะปราง และมะม่วง มีการรายงานเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ โดยเฉพาะมะปราง (*Bouea macrophylla* Griffith) ซึ่งเป็นพืชที่มีลักษณะคล้ายกันกับมะยงชิดมีการรายงานว่ามีสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของมะปรางเป็นแหล่งของสารพฤกษเคมีที่สำคัญที่มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ โดยมีฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน แทนนิน เทอร์พีนอยด์

และสเตียรอยด์ เป็นองค์ประกอบหลัก [10] อีกทั้งสารสกัดจากใบมะปรางยังมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียก่อโรคทั้งชนิดแกรมบวกและลบ ลดเลื้อนริ้วรอย มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase และฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง HeLa และ HCT116 [11, 12] ส่วนเมล็ดมะปรางพบว่า มีฤทธิ์ช่วยในการต้านเนื้องอก และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพต่อการรักษาโรคมะเร็ง HNSCC ด้วยรังสีหรือเคมีบำบัด [13] จากข้อมูลที่ได้กล่าวมาข้างต้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้น ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT จากสารสกัดหยาบของกิ่งมะยงชิดที่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วแตกต่างกัน 3 ชนิด (เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล) เพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ เครื่องสำอาง หรือเภสัชภัณฑ์ต่อไปในอนาคต

2. วิธีการวิจัย

2.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างกิ่งมะยงชิดสด ณ พื้นที่ตำบลไกรนอก อำเภอกงไกรลาศ จังหวัดสุโขทัย ในช่วงเดือนเมษายน พ.ศ. 2566 โดยทำการเก็บรักษาตัวอย่างไว้ในห้องเก็บรวบรวมตัวอย่างพรรณไม้ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม (Voucher Specimen No. PSRU 1010)

2.2 การเตรียมสารสกัดหยาบกิ่งมะยงชิด

นำตัวอย่างกิ่งมะยงชิดสดมาล้างให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาบดให้ละเอียด ซึ่งน้ำหนักตัวอย่างบดละเอียด 1,000 กรัม สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ตามลำดับความมีขั้วของตัวทำละลาย (เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล) โดยใช้วิธีการแช่หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์ (ทำการแช่หมัก 2 ครั้ง) กรองและระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน (Rotary evaporator) จะได้สารสกัดหยาบของกิ่งมะยงชิด และคำนวณหาผลผลิตที่ได้เป็นร้อยละ (%Yield) และเก็บ

ไว้ในภาชนะที่มีฝาปิดสนิทป้องกันแสงที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อทำการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

2.3 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening)

การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นจากสารสกัดหยาบเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอลของกิ่งมะยงชิด ด้วยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน จำนวน 10 กลุ่ม ได้แก่ ฟีนอลิก ซาโปนิน ฟลาโวนอยด์ สเตียรอยด์ อัลคาลอยด์ ไกลโคไซด์ แอนทราควิโนน ไตรเทอร์พีน ไดเทอร์พีน และแทนนิน [14] โดยมีขั้นตอนทดลองดังนี้

2.3.1 การตรวจสอบฟีนอลิก (Phenolic test)

นำสารสกัดหยาบ 5 mg ละลายด้วย 95% เอทานอล 1 mL จากนั้นเติม 5% w/v เฟอริกคลอไรด์ (FeCl_3) 3-4 หยด หากพบสารกลุ่มฟีนอลิก สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินหรือสีดำ

2.3.2 การตรวจสอบซาโปนิน (Saponin test)

นำสารสกัดหยาบ 5 mg ละลายด้วย 95% เอทานอล 1 mL เติมน้ำกลั่น 2 mL และเขย่า หากพบสารกลุ่มซาโปนิน สารละลายจะต้องมีฟองเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง

2.3.3 การตรวจสอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoid tests) จะทำการทดสอบด้วยกัน 3 วิธี ได้แก่

- การตรวจสอบด้วยน้ำยาอัลคาไลน์ (Alkaline reagent test) นำสารสกัดหยาบ 5 mg ละลายด้วย 95% เอทานอล 1 mL แล้วเติม 10% w/v โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 2-3 หยด หากพบฟลาโวนอยด์ สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้ม

- การตรวจสอบด้วยเลดอะซิเตท (Lead acetate test) นำสารสกัดหยาบ 5 mg ละลายด้วย 95% เอทานอล 1 mL จากนั้นเติม 10% w/v เลดอะซิเตท [$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$] 3-4 หยด หากพบอนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์ จะปรากฏตะกอนสีขาวขุ่นขึ้นที่ก้นหลอดทดลอง

- การตรวจสอบด้วยลวดแมกนีเซียม (Magnesium wire test) นำสารสกัดหยาบ 100 mg ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 mL ใส่ลวดแมกนีเซียม 1-2 ชิ้น จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Conc. HCl) 2-3 หยด หากพบฟลาโวนอยด์ สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูหรือสีแดง

2.3.4 การตรวจสอบสเตียรอยด์ (Steroid test)

นำสารสกัดหยาบ 1 mg ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม (CHCl_3) 1 mL แล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Conc. H_2SO_4) 1 mL หากพบสารกลุ่มสเตียรอยด์ สารละลายชั้นล่างจะเปลี่ยนเป็นสีแดง

2.3.5 การตรวจสอบอัลคาลอยด์ (Alkaloid test)

นำสารสกัดหยาบ 5 mg ละลายด้วย 95% เอทานอล 1 mL แล้วเติมสารละลาย Wagner's reagent 2-3 หยด ถ้าพบสารกลุ่มอัลคาลอยด์ จะปรากฏตะกอนสีน้ำตาลที่ก้นหลอดทดลอง

2.3.6 การตรวจสอบไกลโคไซด์ (Glycoside test)

นำสารสกัดหยาบ 500 mg ละลายด้วยน้ำกลั่น 5 mL จากนั้นเติมกรดอะซิติกเข้มข้น (Conc. CH_3COOH) 2 mL ตามด้วย 5% w/v เฟอริกคลอไรด์ (FeCl_3) 2-3 หยด แล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Conc. H_2SO_4) 1 mL ที่ข้างหลอด ถ้าพบสารกลุ่มไกลโคไซด์ จะมีวงแหวนสีม่วงหรือวงแหวนสีม่วงไต้วงแหวนสีน้ำตาลปรากฏขึ้น

2.3.7 การตรวจสอบแอนทราควิโนน (Anthraquinone test)

นำสารสกัดหยาบ 100 mg ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม (CHCl_3) 5 mL เขย่าแล้วกรองสารละลาย จากนั้นเติม 10% v/v แอมโมเนีย (NH_3) 2 mL ถ้าพบอนุพันธ์ของแอนทราควิโนน จะปรากฏสีชมพู สีส้ม หรือสีแดงขึ้นในสารละลายชั้นบน

2.3.8 การตรวจสอบไดเทอร์พีน (Diterpene test)

นำสารสกัด 100 mg ละลายด้วยน้ำกลั่น 5 mL อุณหภูมิ 10 นาที และกรองสารละลาย จากนั้นเติม 10% w/v คอปเปอร์อะซิเตท $[Cu(CH_3COO)_2]$ 2-3 หยด หากพบสารกลุ่มไดเทอร์พีน สารละลายจะปรากฏเป็นสีเขียวอมรक्त

2.3.9 การตรวจสอบไตรเทอร์พีน (Triterpene test)

นำสารสกัด 100 mg ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$) 5 mL เขย่าแล้วกรองสารละลาย จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Conc. H_2SO_4) 2 mL แล้วเขย่าอีก 2-3 นาที ถ้าพบอนุพันธ์ของไตรเทอร์พีน สารละลายชั้นล่างจะปรากฏสีน้ำตาลแดงขึ้น

2.3.10 การตรวจสอบแทนนิน (Tannin tests) จะทำการทดสอบด้วยกัน 2 วิธี ได้แก่

- การตรวจสอบด้วยเจลาติน (Gelatin test) นำสารสกัด 100 mg ละลายด้วยน้ำกลั่น 5 mL เติมน้ำเจลาติน (Gelatin) 2-3 หยด หากมีแทนนิน จะปรากฏตะกอนสีขาวขุ่นที่ก้นหลอดทดลอง

- การตรวจสอบด้วยเลดอะซิเตท (Lead acetate test) นำสารสกัด 100 mg ละลายด้วยน้ำกลั่น 5 mL เติมน้ำเลดอะซิเตท $[Pb(CH_3COO)_2]$ 2-3 หยด ถ้าพบอนุพันธ์ของแทนนิน สารละลายจะเกิดตะกอนสีขาวขุ่นที่ก้นหลอดทดลอง

2.4 การตรวจหาปริมาณฟีนอลิกรวม (Total phenolic content; TPC)

การหาปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin Ciocalteu reagent [15] โดยการนำสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 0.1 mg/mL ลงใน 96 well plate 12.5 μ L เติมน้ำกลั่น 12.5 μ L และ Folin-Ciocalteu reagent 12.5 μ L ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่น 100 μ L และ 7.5% w/v โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 125 μ L เขย่าและตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องอีก 90 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 nm ด้วย Microplate reader แล้วนำค่าที่ได้มา

คำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวมโดยเทียบกับกราฟของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) และรายงานผลในหน่วย mg GAE/g DW โดยจะทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง ($n=3$) จากนั้นนำผลการทดลองที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean±S.D.)

2.5 การตรวจหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoid content; TFC)

การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมด้วยวิธี aluminium chloride colorimetric [16] โดยการนำสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 0.5 mg/mL ลงใน 96 well plate 125 μ L เติมน้ำ 5% w/v โซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_2$) 12.5 μ L และตั้งทิ้งไว้ในที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมน้ำ 10% w/v อะลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3$) 37.5 μ L เขย่าและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm ด้วย Microplate reader แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมโดยเทียบกับกราฟของสารละลายมาตรฐานเคอร์ควิติน (Quercetin) และรายงานผลในหน่วย mg QE/g DW โดยจะทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง ($n=3$) จากนั้นนำผลการทดลองที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean±S.D.)

2.6. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activities)

2.6.1 การทดสอบด้วยวิธี DPPH Radical scavenging activity

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH [17] ทำได้โดยเตรียมสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 1.0 mg/mL และทำการเจือจางในความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นนำสารละลายตัวอย่าง 100 μ L ลงใน 96 well plate เติมน้ำ 0.2 mM DPPH 100 μ L เขย่าและตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ด้วย Microplate reader และนำค่าที่ได้มาคำนวณหาร้อยละความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%Radical scavenging) โดยใช้สูตรคำนวณ ดังนี้

$$\%DPPH \text{ Radical scavenging activity} = [(A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}) / A_{\text{Control}}] \times 100$$

เมื่อ A_{Control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH (ไม่ผสมสารตัวอย่าง)

A_{Sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยากับ DPPH

ทำการสร้างกราฟคำนวณหาร้อยละความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (%Radical scavenging) และความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง เพื่อหาความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50% (IC_{50}) เทียบกับสารละลายมาตรฐานวิตามินซี (L-Ascorbic acid) ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง ($n=3$) จากนั้นนำผลการทดลองที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean±S.D.)

2.6.2 การทดสอบด้วยวิธี ABTS Radical scavenging activity

เตรียมสารละลาย ABTS^{•+} (7 mM ABTS 4 mL ทำปฏิกิริยากับ 2.4 mM $K_2S_2O_8$ 6 mL) ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12-14 ชั่วโมง เพื่อให้ ABTS^{•+} เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ จากนั้นเจือจางสารละลาย ABTS^{•+}: Ethanol ในอัตราส่วน 1:50 mL นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ด้วย Microplate reader ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 0.70-0.71 [18] เตรียมสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 1.0 mg/mL และทำการเจือจางในความเข้มข้นที่เหมาะสมลงใน 96 well plate 20 μ L เติมสารละลาย ABTS^{•+} 180 μ L เขย่าและตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องอีก 6 นาที ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm และนำค่าที่ได้มาคำนวณหาร้อยละความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%Radical scavenging) โดยใช้สูตรคำนวณ ดังนี้

$$\%ABTS \text{ Radical scavenging activity} = [(A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}) / A_{\text{Control}}] \times 100$$

เมื่อ A_{Control} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS^{•+} (ไม่ผสมสารตัวอย่าง)

A_{Sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยากับ ABTS^{•+}

ทำการสร้างกราฟคำนวณหาร้อยละความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (%Radical scavenging) และความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง เพื่อหาความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ได้ 50% (IC_{50}) เทียบกับสารละลายมาตรฐานวิตามินซี (L-Ascorbic acid) ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง ($n=3$) จากนั้นนำผลการทดลองที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean±S.D.)

2.6.3 การทดสอบด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

เตรียมสารละลาย FRAP reagent (300 mM Acetate buffer pH 3.6; 20 mM $FeCl_3$; 10 mM TPTZ ใน 40 mM HCl อัตราส่วน 10:1:1 mL) [19] เตรียมสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 0.05 mg/mL ลงใน 96 well plate 20 μ L เติมสารละลาย FRAP reagent 180 μ L เขย่าและตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาที ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm ด้วย Microplate reader นำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณของ Fe^{2+} โดยเทียบกับกราฟของสารละลายมาตรฐาน $FeSO_4$ และรายงานผลในหน่วย mg $FeSO_4$ equivalent/g DW โดยจะทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง ($n=3$) จากนั้นนำผลการทดลองที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean±S.D.)

2.7 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ Human keratinocyte immortal (HaCaT)

2.7.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์

เพาะเลี้ยงเซลล์ HaCaT (บริษัท AddexBio Technologies, San Diego, CA, USA.) จำนวน 1×10^5 cells/mL ลงใน 96 well plate ปริมาตร 100 μ L/well ที่มีอาหาร DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium, Gibco), 4 mM L-glutamine (Gibco), 5% (v/v) FBS (Fetal bovine serum, Gibco) และ 1% (v/v) ยาปฏิชีวนะ (100 IU/mL Penicillin และ 100 μ g/mL Streptomycin, Gibco) แล้วทำการบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO₂ ในบรรยากาศเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.7.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังชั้นนอกของมนุษย์ด้วยวิธี MTT [20] โดยเตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1,000 μ g/mL ด้วย 100% DMSO แล้วเจือจางตัวอย่างด้วยอาหาร DMEM+5%FBS ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1,000 μ g/mL โดยมีความเข้มข้นของ DMSO สูงสุดไม่เกิน 1% แล้วกรองตัวอย่างด้วยแผ่นกรองขนาด 0.45 μ m จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยง เติมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1,000 μ g/mL ลงไป 100 μ L/well บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO₂ ในบรรยากาศเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อบ่มเซลล์ในสารละลายตัวอย่างครบตามเวลาที่กำหนด เติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 mg/mL ลงไป 10 μ L/well นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5% CO₂ นาน 4 ชั่วโมง เมื่อครบ 4 ชั่วโมง ดูดสารละลาย MTT ที่แล้วเติมสารที่ละลายผลึก Formazan (100% DMSO : 10% SDS อัตราส่วน 9:1 mL) ปริมาตร 100 μ L/well เขย่าเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ด้วย Microplate reader นำค่าที่ได้มาคำนวณหาร้อยละความเป็นพิษต่อเซลล์ (%Cytotoxicity) โดยใช้สูตร ดังนี้

$$\%Cytotoxicity = [(A_{Control} - A_{Sample}) / A_{Control}] \times 100$$

เมื่อ $A_{Control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุม (หลุมที่มีเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยง)

A_{Sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่มีเซลล์ในสารละลายตัวอย่าง

โดยค่า $A_{Control}$ และ A_{Sample} จะต้องนำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายผลึก Formazan (100% DMSO : 10% SDS) มาทำการหักลบออกก่อน จากนั้นจึงนำค่าที่ได้ไปคำนวณในสูตรข้างต้น โดยจะทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง (n=3) และนำผลการทดลองที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean±S.D.)

2.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ในการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และความเป็นพิษต่อเซลล์จากกิงมะยงชิดที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 3 ชนิด จะทำการทดลองซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง (n=3) แสดงผลการวิเคราะห์ในรูปของค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean±S.D.) การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) และความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติโดยใช้วิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p-value < 0.05)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

3.1 การเตรียมสารสกัดหยาบกิงมะยงชิด

จากการสกัดกิงมะยงชิดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล และระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ จะได้สารสกัดหยาบของกิงมะยงชิดที่มีลักษณะทางกายภาพและร้อยละผลผลิต %Yield = [(น้ำหนักสารสกัดหยาบ (g) / น้ำหนักตัวอย่างแห้ง (g)) × 100] (Table 1)

Table 1 The extracts from twigs of *B. burmanica* in different solvent extractions.

Extracts	Characteristics of extracts	Weight (g)	%Yield
Hexane	Dark brown sticky	5.87	0.59
Ethyl acetate	Brown sticky	8.52	0.85
Methanol	Brown sticky	50.57	5.06

3.2 ผลการตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น

ผลการตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบกิ่งมะยงชิดทั้ง 3 ชนิด พบกลุ่มสารพฤกษเคมี

7 กลุ่ม ได้แก่ ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ สเตียรอยด์ แอนทราควิโนน ไตรเทอร์พีน ไดเทอร์พีน และแทนนิน (Table 2)

Table 2 The phytochemical screening from twigs of *B. burmanica* extracts.

Phytochemicals	Results		
	Hexane	Ethyl acetate	Methanol
Phenolics	+	+	+
Saponins	-	-	-
Flavonoids - Alkaline reagent test	-	+	+
- Lead acetate test	-	+	+
- Magnesium wire test	-	+	+
Steroids	+	+	+
Alkaloids	-	-	-
Glycosides	-	-	-
Antraquinones	+	+	+
Diterpenes	+	+	+
Triterpenes	+	+	+
Tannins - Gelatin test	-	+	+
- Lead acetate test	-	+	+

Remarks + indicates presence, - indicates absence.

3.3 ผลการตรวจหาปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม (Total Phenolic Content; TPC and Total Flavonoid Content; TFC)

การตรวจหาปริมาณฟีนอลิกรวมจากสารสกัดหยาบของกิ่งมะยงชิดทั้ง 3 ชนิด สามารถคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดแต่ละชนิดได้จากกราฟของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid)

($y = 5.0992x + 0.0689$; $R^2 = 0.9987$) โดยจะรายงานผลการทดลองในหน่วย mg GAE/g DW ส่วนการหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสามารถคำนวณได้จากกราฟของสารละลายมาตรฐานเคอควิติน (Quercetin) ($y = 2.8795x + 0.0843$; $R^2 = 0.9979$) และรายงานผลการทดลองในหน่วย mg QE/g DW (Table 3)

3.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดหยาบของกิ่งมะยงชิดที่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด ด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP พบว่า สารสกัดหยาบของกิ่งมะยงชิดที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่

มีขั้วแตกต่างกันจะให้ผลฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ต่างกัน โดยการทดสอบด้วยวิธี DPPH และ ABTS จะรายงานผลการทดลองเป็นค่า IC_{50} ส่วนการทดสอบด้วยวิธี FRAP ในการรีดิวซ์โดยให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระจะรายงานผลการทดลองเป็นค่า FRAP value ในหน่วย $mg\ FeSO_4\ equivalent/g\ DW$ (Table 3)

Table 3 The phytochemical contents and antioxidant activities of DPPH, ABTS and FRAP assays from twigs of *B. burmanica* extracts.

Extracts	Phytochemical contents		Antioxidant activities		
	TPC (mg GAE/g DW)	TFC (mg QE/g DW)	IC_{50} of DPPH ($\mu g/mL$)	IC_{50} of ABTS ($\mu g/mL$)	FRAP value (mg $FeSO_4$ equivalent/g DW)
Hexane	0.67±0.03 ^a	-	36.60±0.98 ^c	197.47±1.06 ^c	7.83±0.15 ^a
Ethyl acetate	2.35±0.14 ^a	0.25±0.01 ^a	8.29±0.18 ^b	78.30±2.41 ^b	26.20±0.26 ^b
Methanol	20.24±3.77 ^b	5.41±0.12 ^b	1.14±0.17 ^a	47.86±1.39 ^a	227.87±3.85 ^c

Remarks - Indicates the absence of constituents.

L-Ascorbic acid (Vitamin C) was used as standard solution to compare with samples by using DPPH and ABTS assays (IC_{50} of L-Ascorbic acid were 0.630±0.04 and 35.10±1.05 $\mu g/mL$, respectively).

The values were expressed as Mean±S.D. (n=3), different letters (a-c) indicate statistically significant differences ($p<0.05$).

3.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ Human keratinocyte immortal (HaCaT)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT จากสารสกัดเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอลที่ความเข้มข้น 1,000 $\mu g/mL$ โดยเทียบกับตัวแปรควบคุมผลเชิงบวก 1% DMSO (Table 4)

Table 4 The cytotoxic screening effects from twigs of *B. burmanica* extracts (1,000 $\mu g/mL$) on HaCaT cell line.

Extracts	%Cytotoxicity
Hexane	60.12±0.07 ^c
Ethyl acetate	39.19±0.04 ^a
Methanol	42.29±0.03 ^b

Remarks 1% DMSO was used as positive control (%Cytotoxicity of 1% DMSO was 2.30±0.01). The values were expressed as Mean±S.D. (n=3), different letters (a-c) indicate statistically significant differences ($p<0.05$).

การสกัดกั้นเมยงชิดด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล พบว่า สารสกัดเมทานอล มีปริมาณสูงสุด (5.06%) รองลงมาคือสารสกัดเอทิลอะซิเตท (0.85%) และเฮกเซน (0.59%) ตามลำดับ การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นจากสารสกัดทั้ง 3 ชนิด ด้วยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน พบสารพฤกษเคมี 7 กลุ่ม โดยพบว่าสารสกัดทั้ง 3 ชนิด จะมีฟีนอลิก สเตียรอยด์ แอนทราควิโนน ไตรเทอร์พีน และไตรเทอร์พีน เป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนสารสกัดเอทิลอะซิเตทและเมทานอลซึ่งมีค่าที่สูงขึ้น จะพบกลุ่มสารเพิ่มอีก 2 กลุ่ม คือ ฟลาโวนอยด์และแทนนินอีกด้วย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Widyawati และคณะ, 2014 [21] พบว่า สภาพผิวของตัวทำละลายที่แตกต่างกันในกระบวนการสกัดมีผลต่อการสกัดกลุ่มสารพฤกษเคมีที่แตกต่างกัน โดยจะขึ้นอยู่กับโครงสร้างและชนิดของสาร กลุ่มสารพฤกษเคมีที่พบในการศึกษารังนี้ จัดเป็นกลุ่มสารที่มีบทบาทสำคัญต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเฉพาะสารกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่มีการรายงานถึงฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างกว้างขวาง เช่น ช่วยเสริมระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายในการกำจัดเชื้อโรค แสดงศักยภาพในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาถูกโซ่ อันเนื่องมาจากอนุมูลอิสระ ช่วยควบคุมระดับอนุมูลอิสระในร่างกายให้อยู่ในสภาวะสมดุล ด้านเชื้อแบคทีเรีย ที่ก่อโรคทั้งชนิดแกรมบวกและลบ ลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจ ด้านการอักเสบของร่างกาย ปกป้องผิวจากรังสียูวี และยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง [22] ซึ่งสารกลุ่มโพลีฟีนอลส่วนใหญ่มักจะละลายในตัวทำละลายที่มีขั้วค่อนข้างสูงเนื่องจากเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ [23] สารกลุ่มสเตียรอยด์ที่ได้จากพืชยังจัดเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบ ด้านเชื้อแบคทีเรีย ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ลดความเสี่ยงของโรคเบาหวาน ลดความดันโลหิต ลดความเสี่ยงของโรคหัวใจ และยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง [24] ส่วนการรายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารแอนทราควิโนน พบว่า มีการใช้สารกลุ่มนี้ในการรักษาโรคมะเร็ง [25]

มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อไวรัสและเชื้อแบคทีเรีย ด้านเชื้อรา ด้านการเกิดเนื้องอกซึ่งเป็นสาเหตุของโรคมะเร็ง ยับยั้งเอนไซม์ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน เสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย [26, 27] สารกลุ่มไตรเทอร์พีนและไดเทอร์พีน ได้มีการรายงานถึงการใช้ประโยชน์ของสารกลุ่มนี้ในการเป็นยารักษาโรคมะเร็ง และต้านมะเร็งในมนุษย์หลายชนิด อีกทั้งยังใช้เป็นแหล่งของสารอาหารที่มีสรรพคุณทางยา เสริมสร้างการทำงานของฮอร์โมนในร่างกาย และมีการใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง [28] และสารกลุ่มแทนนินได้มีการรายงานถึงฤทธิ์ทางชีวภาพอีกเช่นกันว่าเป็นแหล่งของสารที่ทำหน้าที่ต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารชีวโมเลกุล เช่น ด้านการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน ด้านซูเปอร์ออกไซด์ และต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น [29] ผลการตรวจหาปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวมจากสารสกัดทั้ง 3 ชนิด พบว่า สารสกัดเมทานอลมีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุด รองลงมาคือสารสกัดเอทิลอะซิเตท และเฮกเซน ตามลำดับ (20.24 ± 3.77 2.35 ± 0.14 และ 0.67 ± 0.03 mg GAE/g DW ตามลำดับ) การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมจากสารสกัดเอทิลอะซิเตทและเมทานอล (ไม่พบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในสารสกัดเฮกเซน) พบว่า สารสกัดเมทานอลมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงสุด รองลงมาคือสารสกัดเอทิลอะซิเตท ตามลำดับ (5.41 ± 0.12 และ 0.25 ± 0.01 mg QE/g DW ตามลำดับ) ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS พบว่าสารสกัดเมทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระดีที่สุด (IC_{50} เท่ากับ 1.14 ± 0.16 และ 47.86 ± 1.39 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ) รองลงมาคือสารสกัดเอทิลอะซิเตท (IC_{50} เท่ากับ 8.29 ± 0.18 และ 78.30 ± 2.41 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ) และเฮกเซน (36.60 ± 0.98 และ 197.47 ± 1.06 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ) ส่วนการทดสอบด้วยวิธี FRAP โดยการรีดิวซ์จาก Fe^{3+} ให้เป็น Fe^{2+} ซึ่งเปรียบเสมือนกับการให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระเพื่อให้อนุมูลอิสระอยู่ในสภาวะที่เสถียร พบว่า สารสกัดเมทานอลสามารถให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระได้ดีที่สุด รองลงมา

คือเอทิลอะซิเตท และเฮกเซน ตามลำดับ (FRAP values เท่ากับ 227.87 ± 3.85 , 26.20 ± 0.26 และ 7.83 ± 0.15 mg FeSO₄ equivalent/g DW ตามลำดับ) จากรายงานของ Hafshejani และคณะ, 2020 [30] พบว่า ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวมจะแปรผันตรงกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ ยังได้ทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังชั้นนอกของมนุษย์ (HaCaT) จากสารสกัดทั้ง 3 ชนิด ที่ความเข้มข้น 1,000 µg/mL พบว่า สารสกัดเอทิลอะซิเตทมีค่าร้อยละความเป็นพิษน้อยที่สุด (39.19 ± 0.04) รองลงมาคือสารสกัดเมทานอล (42.29 ± 0.03) และเฮกเซน (60.12 ± 0.07) ตามลำดับ โดยเทียบกับตัวแปรควบคุมผลเชิงบวก 1% DMSO (2.30 ± 0.01) ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้เป็นการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในเบื้องต้น จึงควรมีการทำการทดสอบในเชิงลึกเพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังชั้นนอกของมนุษย์ รวมถึงการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการนำไปศึกษาและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพต่อไปในอนาคต จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นได้ว่า ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT ของสารสกัดทั้ง 3 ชนิด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

4. สรุปผล

สารสกัดจากกิ่งมะยงชิดเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีศักยภาพ อุดมไปด้วยองค์ประกอบของสารพฤกษเคมีที่สำคัญต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเฉพาะสารสกัดจากกิ่งมะยงชิดที่สกัดด้วยเมทานอล ที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีศักยภาพทั้งการทดสอบด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP อีกทั้งยังมีปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดอื่น และมีค่าความเป็น

พิษต่อเซลล์ผิวหนังชั้นนอกของมนุษย์ (HaCaT) ที่ต่ำ จึงควรมีการแยกและมีการระบอบองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ รวมถึงการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ร่วมด้วย เช่น ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านการอักเสบ ทั้งในหลอดทดลองและทางคลินิก เพื่อความปลอดภัยในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง และเภสัชภัณฑ์ในอนาคต

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณกองทุนอุดหนุนการวิจัยและนวัตกรรม มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ประเภททุนวิจัยและนวัตกรรมสำหรับนักศึกษาและบัณฑิตศึกษา (ระดับปริญญาตรี) ประจำปีงบประมาณ 2567 สาขาวิชาเคมี และศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ที่ให้การสนับสนุนเครื่องมือ อุปกรณ์ และสถานที่ทำการวิจัยในการทดลองครั้งนี้ ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

6. References

- [1] Kaewsangsa, S., Panyadee, P., Panya, A., Pandith, H., Wangpakapattanawong, P., Balslev, H. and Inta, A., 2024, Diversity of plant colorant species in a biodiversity hotspot in northern Thailand, Diversity. 16(4): 1-15.
- [2] Velavan, S., 2015, Phytochemical techniques : A review, World J. Sci. Res. 1(2): 80-91.
- [3] Chakraborty, S.B., and Hancz, C., 2011, Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture, Rev. Aquac. 3(3): 103-119.

- [4] De Silva, G.O., Abeysundara, A.T. and Aponso, M.M.W., 2017, Extraction methods, qualitative and quantitative techniques for screening of phytochemicals from plants, *Am. J. Essent. Oil Nat. Prod.* 5(2): 29-32.
- [5] Rao, B.N., 2003, Bioactive phytochemicals in Indian foods and their potential in health promotion and disease prevention, *Asia Pacific J. Clin. Nutr.* 12(1): 9-22.
- [6] Thomford, N.E., Senthebane, D.A., Rowe, A., Munro, D., Seele, P., Maroyi, A. and Dzobo, A., 2018, Natural products for drug discovery in the 21st century: Innovations for novel drug discovery, *Int. J. Mol. Sci.* 19(6): 1-29.
- [7] Boonwong, T., Chumpookam, J. and Yapwattanaphun, C., 2017, Effect of colors of bagging material on fruit quality of 'Toon Klaow' marian plum (*Bouea burmanica* Griff.), *TJST.* 6(3): 214-220. (in Thai)
- [8] Seekhaw, P., Narmayhom, N., Promla, N., Sukonpakdee, N., Na Wichian, K., Yoopech, S. and Jutiviboonsuk, A., 2022, Study of color hues and fastness of natural dyes from the leaves of *Bouea burmanica* Griff. on silk and cotton, *PSRU J. Sci. Tech.* 7(2): 89-102. (in Thai)
- [9] Seekhaw, P., Narmayhom, N., Promla, N., Na Wichian, K. and Jutiviboonsuk, A., 2022, Phytochemical screening, acute toxicity against skin irritation and corrosion in rabbits of aqueous fabric dye from *Bouea burmanica* Griff. leaf extract, *PSRU J. Sci. Tech.* 7(1): 117-128. (in Thai)
- [10] Fu'adah, I.T., Sumiwi, S.A. and Wilar, G., 2022, The evolution of pharmacological activities *Bouea macrophylla* Griffith *in vivo* and *in vitro* study: A review, *Pharmaceuticals.* 15(2): 1-23.
- [11] Nguyen, N.H., Nguyen, T.T., Ma, P.C., Ta, Q.T., Duong, T.H. and Vo, V.G., 2020, Potential antimicrobial and anticancer activities of an ethanol extract from *Bouea macrophylla*, *Molecules.* 25(8): 1-15.
- [12] Ha, K.N., Nguyen, T.V.A., Mai, D.T., Tran, N.M.A., Nguyen, N.H., Vo, G.V., Duong, T.H. and Nguyen, H.T., 2022, Alpha-glucosidase inhibitors from *Nervilia concolor*, *Tecoma stans*, and *Bouea macrophylla*, *Saudi J. Biol. Sci.* 29: 1029-1042.
- [13] Kantapan, J., Dechsupa, N., Tippianya, D., Nobnop, W. and Chitapanarux, I., 2021, Gallotannin from *Bouea macrophylla* seed extract suppresses cancer stem-like cells and radiosensitizes head and neck cancer, *Int. J. Mol. Sci.* 22(17): 1-25.

- [14] Shaikh, J.R. and Patil, M.K., 2020, Qualitative tests for preliminary phytochemical screening: An overview, *Int. J. Chem. Stud.* 8(2): 603-608.
- [15] Majhenič, L., Škerget, M. and Knez, Z., 2007, Antioxidant and antimicrobial activity of Guarana seed extracts, *Food Chem.* 104(3): 1258-1268.
- [16] Maninder, K., Bavita, A. and Gulshan, M., 2017, Variation in antioxidants, bioactive compounds and antioxidant capacity in germinated and ungerminated grains of ten rice cultivars, *Rice Sci.* 24(6): 349-359.
- [17] Vorarat, S., Managi, C., lamthanakul, T.L., Soparat, W. and Kamkean, N., 2010, Examination of antioxidant activity and development of rice bran oil and gamma-oryzanol microemulsion, *J. Health Res.* 24(2): 67-72.
- [18] Pang, Y., Ahmed, S., Xu, Y., Beta, T., Zhu, Z., Shao, Y. and Bao, J., 2018, Bound phenolic compounds and antioxidant properties of whole grain and bran of white, red and black rice, *Food Chem.* 240(1): 212-221.
- [19] Benzie, I.F.F. and Strain, J.J., 1996, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power" The FRAP assay, *Anal. Biochem.* 239(1): 70-76.
- [20] International Organization for Standardization (ISO), 2009, Biological evaluation of medical devices, Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity, 3rd Ed., Geneva, Switzerland, 34 p.
- [21] Widyawati, P.S., Budianta, T.D.W., Kusuma, F.A. and Wijaya, E.L., 2014, Difference of solvent polarity to phytochemical content and antioxidant activity of *Pluchea indica* Less leaves extracts, *IJPPR.* 6(4): 850-855.
- [22] Tungmunthum, D., Thongboonyou, A., Pholboon, A. and Yangsabai, A., 2018, Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview, *Medicines.* 5(3): 1-16.
- [23] Arroussia, J., Ouerfellib, M., Smaouic, A., Ben Ahmeda, H., Ben Kaab, S. and Ben Kaab, L.B., 2022, Antioxidant activity of seven plant extracts collected from Tunisia and their allelopathic potential on *Lactuca sativa* L. and *Phalaris minor* L., *S. AFR. J. BOT.* 148: 135-143.
- [24] Karim, S., Akhter, M.H., Burzangi, A.S., Alkreathy, H., Kotta, S., Md, S., Rashid, M.A., Afzal, O., Altamimi, A.S.A. and Khalilullah, H., 2022, Phytosterol-loaded surface-tailored bioactive-polymer nanoparticles for cancer treatment: Optimization, *in vitro* cell viability, antioxidant activity, and stability studies, *Gels.* 8(4): 1-23.
- [25] Osman, C.P. and Ismail, N.H., 2018, Antiplasmodial anthraquinones from medicinal plants: The chemistry and possible mode of actions, *Nat. Prod. Commun.* 13(12): 1591-1597.

- [26] Masi, M. and Evidente, A., 2020, Fungal bioactive anthraquinones and analogues, *Toxins*. 12(11): 1-30.
- [27] Greco, G., Turrini, E., Catanzaro, E. and Fimognari, C., 2021, Marine anthraquinones: pharmacological and toxicological issues, *Marine drugs*. 19(5): 1-49.
- [28] Mabou, F.D. and Yossa, I.B.N., 2021, Terpenes: Structural classification and biological activities, *IOSR J. Pharm. Biol. Sci.* 16(3): 25-40.
- [29] Ho, K.Y., Huang, J.S., Tsai, C.C., Lin, T.C., Hsu, Y.F. and Lin, C.C., 1999, Antioxidant activity of tannin components from *Vaccinium vitis-idaea* L., *J. Pharm. Pharmacol.* 51(9): 1075-1078.
- [30] Hafshejani, S.F., Lotfi, S., Rezvannejad, E., Mortazavi, M. and Riahi-Madvar, A., 2022., Correlation between total phenolic and flavonoid contents and biological activities of 12 ethanolic extracts of *Iranian propolis*, *Food Sci. Nutr.* 11: 4308-4325.